

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :

2 767 058

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

97 10009

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 31/20

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 05.08.97.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLISS
PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR et CON-
SEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFI-
CAS — ES.

(72) Inventeur(s) : BOUILLAUD FREDERIC, RICQUIER
DANIEL et RIAL EDUARDO.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.02.99 Bulletin 99/06.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) UTILISATION D'UN COMPOSE DE TYPE RETINOIDE, NOTAMMENT L'ACIDE RETINOIQUE POUR LA
PREPARATION D' UN MEDICAMENT DESTINE AU TRAITEMENT DE L'OBESITE.

(57) La présente invention concerne l'utilisation d'un composé de type rétinol, notamment l'acide rétinol pour la préparation d'un médicament capable de moduler in vivo l'activité découplante de protéines de découplage. Ces composés peuvent être avantageusement utilisés pour le traitement de maladies associées à une augmentation ou une diminution de l'activité de protéines de découplage. Selon un mode de réalisation préféré, on utilisera l'acide rétinol pour traiter des maladies associées à une diminution de l'activité découplante de la protéine UCP2, telle que par exemple l'obésité.

FR 2 767 058 - A1



UTILISATION D'UN COMPOSE DE TYPE RETINOIDE, NOTAMMENT L'ACIDE
RETINOIQUE POUR LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT DESTINE AU
TRAITEMENT DE L'OBESEITE

5 La présente invention concerne de nouvelles applications thérapeutiques de composés de type rétinolide, notamment de l'acide rétinolique.

Les rétinolides, et en particulier l'acide rétinolique, sont connus comme des molécules naturelles ayant des effets importants sur la différenciation des cellules. L'acide rétinolique (vitamine A acide) a notamment déjà trouvé une application très efficace dans le traitement des formes d'acné sévères.

15 Les nouvelles applications thérapeutiques envisagées pour l'acide rétinolique relèvent d'un tout autre domaine, celui des désordres et maladies associés à l'augmentation ou à la diminution de l'expression ou de l'activité de protéines de découplage.

La respiration cellulaire est un mécanisme d'oxydation des 20 composés carbonés qui libère de l'énergie. Elle se produit dans les mitochondries, organites responsables de la respiration cellulaire. L'énergie ainsi libérée est captée par l'organisme sous diverses formes dont notamment la synthèse de la matière vivante, l'entretien des cellules etc... Si la récupération d'énergie est défectueuse, l'oxydation se poursuit, mais une 25 plus grande proportion de cette énergie est immédiatement dissipée en chaleur. La rupture du lien entre respiration et récupération d'énergie au niveau des mitochondries, porte le nom de découplage. La qualité du couplage des mitochondries 30 peut être mesurée directement et on observe dans de nombreux cas, un défaut dans ce couplage chez de nombreux organismes, y compris les végétaux et les organismes unicellulaires, notamment les levures. Il en résulte une production excédentaire de chaleur qui est régulée par deux types de 35 mécanismes :

soit une régulation de l'expression des gènes codant pour certaines protéines, appelées protéines de découplage ou protéines UCP ;

soit une activation directe de ces mêmes protéines.

5 Plusieurs protéines UCP ont déjà été identifiées comme étant responsables d'un découplage de la respiration et donc de la dissipation d'une partie de l'énergie en chaleur chez les mammifères.

10 Une première protéine, UCP1, a été identifiée comme responsable de ce mécanisme dans un organe particulier, le tissu adipeux brun spécialisé pour la thermogénèse et actif chez certains animaux et le bébé humain (Himms-Hagen J. (1990), Brown adipose tissue thermogenesis : interdisciplinary studies, FASEB J., 4 2890-2898).

15 Plus récemment, d'autres protéines UCP ont été mises en évidence et notamment des gènes codant pour ces protéines ont été identifiés. Ces protéines ont été respectivement désignées UCP2, protéine exprimée dans presque tous les tissus (C. Fleury, et al. (1997) Uncoupling protein-2 : a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. Nature genetics, 15, 269-272) et UCP3 exprimée presque exclusivement dans le muscle (O. Boss et al. (1997) Uncoupling protein-3 : a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett. 408, 39-42).

25 L'activité de ces protéines UCP, à savoir leur aptitude à dissiper de l'énergie sous forme de chaleur, en fait des cibles thérapeutiques majeures pour le traitement des pathologies, désordres ou maladies associés à la régulation de la dépense énergétique.

30 Plus particulièrement, les applications les plus intéressantes, sont le traitement de l'obésité qui constitue un problème majeur dans la plupart des pays industrialisés, d'autant que, à l'obésité sont souvent associées des pathologies graves telles que certaines formes de diabète ou encore

35 l'hypertension.

En effet, des travaux récents semblent indiquer que l'obésité est associée à un déséquilibre énergétique. En particulier, les modèles génétiques de l'obésité chez le rongeur démontrent que celle-ci s'accompagne d'une réduction de l'activité thermogénique. Des travaux calorimétriques chez l'homme ont aussi démontré un défaut de thermogénèse lié à l'alimentation chez des obèses.

C'est pourquoi, on envisage depuis de nombreuses années, pour le traitement de l'obésité, de mobiliser les mécanismes thermogéniques pour lutter contre l'accumulation des graisses.

Les inventeurs ont maintenant découvert qu'il était possible, par l'utilisation d'un composé de type rétinol, d'agir sur l'activité des protéines de découplage.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'un composé de type rétinol, notamment d'acide rétinol, pour la préparation d'un médicament capable de moduler in vivo l'activité découplante de protéines de découplage.

Par modulation, on entend aussi bien l'augmentation que la diminution de l'activité en question.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par « composés de type rétinol », des composés ayant une activité similaire à celle présentée par l'acide rétinol sur l'activité de la protéine UCP2 telle que définie sur le modèle levure dans la présente invention et une structure similaire à celle de l'acide rétinol, en tenant compte notamment des essais négatifs décrits ci-après qui semblent indiquer l'importance, dans la structure du composé, d'une fonction acide et d'un cycle, de préférence non aromatique. Ces composés de type rétinol comprenant notamment des composés obtenus à partir de l'acide rétinol par délétion ou substitution de certains des éléments de cet acide. L'expression « composés de type rétinol » couvre également tous les stéréoisomères des composés répondant à la définition donnée. Cette expression couvre également les métabolites des composés en question, et leurs précurseurs susceptibles de se transformer en composés de type rétinol au niveau cellulaire.

L'effet de ce type de composés sur l'activité notamment de la protéine UCP2, a été démontré sur un modèle levure. L'essai a consisté à construire des souches de levure *Saccharomyces Cerevisiae* recombinantes capables d'exprimer la protéine UCP2, à en extraire des mitochondries et à mesurer l'activité de la protéine UCP2 en présence ou en absence d'acide rétinolique. Dans le modèle retenu, l'activité découplante de la protéine UCP2 est mesurée quantitativement par le facteur de stimulation de la respiration.

Ce facteur correspond au rapport entre la respiration et la respiration basale, mesurée soit en absence d'acide rétinolique (lorsque les mesures sont effectuées à pH constant, mais en faisant varier la concentration en acide rétinolique) soit à pH 6.8 (lorsque les mesures sont effectuées à une concentration donnée d'acide rétinolique, mais en faisant varier le pH).

La respiration est elle-même déterminée par la mesure de la quantité d'oxygène consommée, exprimée en nanomoles d'oxygène par minute et par milligramme de protéines mitochondriales, la consommation d'oxygène étant directement liée à la quantité de substrat consommée par les mitochondries (en calories).

Il existe également une méthode qualitative de détermination de l'activité de découplage d'une protéine UCP. Il s'agit de la mesure du potentiel membranaire mitochondrial, dont la diminution met en évidence la réduction de la qualité de récupération de l'énergie chimique au niveau des mitochondries. L'activation d'une protéine de découplage est reflétée par une diminution du potentiel membranaire suivie d'une accélération de la respiration.

Les essais ont été menés en particulier sur la protéine UCP2 et de façon surprenante, on a observé que l'acide rétinolique active la dissipation d'énergie par UCP2 en agissant directement sur cette protéine.

C'est pourquoi, selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'un composé de type rétinol, notamment l'acide rétinol, pour la préparation d'un médicament capable d'augmenter l'activité découplante de la

5 protéine UCP2.

Parmi les composés de type rétinol envisageables selon l'invention, on citera de préférence les acides rétinoïques et leurs dérivés, et de façon encore plus préférée, les acides rétinoïques 9-cis et tout trans.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet, l'utilisation de l'acide rétinol pour la préparation d'un médicament capable d'augmenter l'activité découplante de la protéine UCP2.

On a également constaté que l'acide rétinol était capable

15 d'augmenter l'activité découplante de la protéine UCP1.

Bien que ce résultat soit a priori moins intéressant que celui observé avec la protéine UCP2, en termes d'applications thérapeutiques potentielles, puisque la protéine UCP1 est très peu exprimée chez l'homme, il permet néanmoins d'envisager la

20 conception d'activateurs, soit communs à plusieurs protéines UCP, soit spécifiques de l'une d'entre elles seulement. En effet, les résultats négatifs rapportés dans les exemples qui suivent, démontrent que les acides gras, notamment l'acide palmitique, n'ont pas d'effet sur l'activation de la protéine

25 UCP2, mais en ont un sur l'activation de la protéine UCP1. Par contre, l'acide rétinol agit à la fois sur UCP1 et UCP2.

Cette nouvelle activité des composés de type rétinol et notamment de l'acide rétinol, permet d'envisager, et cela constitue l'un des objets de l'invention, une application

30 thérapeutique pour des pathologies associées à une augmentation ou une diminution de l'activité de protéines de découplage. D'une manière générale, on utilisera le terme « pathologies » pour désigner à la fois les désordres physiologiques et les maladies liés à une perturbation de l'activité découplante de

35 protéines de découplage.

Plus particulièrement, les composés de type rétinol, notamment l'acide rétinol, peuvent être utilisés pour le traitement de pathologies associées à une diminution de l'activité découplante de la protéine UCP2.

- 5 Comme indiqué précédemment, l'obésité peut être associée à un déséquilibre énergétique, c'est pourquoi l'invention est directement applicable au traitement de l'obésité, ainsi que de façon avantageuse également au traitement de désordres physiologiques ou maladies liés à l'obésité. On peut envisager
- 10 notamment le traitement de maladies affectant l'état métabolique général. On peut citer ainsi de façon non limitative les différentes formes de diabète, l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose, le syndrome X ou les maladies cardiovasculaires. Enfin, on peut envisager d'utiliser des composés de type
- 15 rétinol également pour le traitement de pathologies affectant le métabolisme de l'oxygène ou de maladies du système de défense immunitaire. Enfin, d'une manière générale, on peut utiliser les composés de type rétinol définis selon l'invention, pour le traitement de toutes les pathologies associées à la régulation
- 20 de la dépense énergétique.

- Selon un autre mode de réalisation, on peut envisager à des fins esthétiques pour l'homme ou afin de moduler le rendement énergétique et la composition corporelle d'organismes d'intérêt agronomique, animal ou végétal, d'utiliser un composé de type
- 25 rétinol, notamment l'acide rétinol. L'invention a donc également pour objet l'utilisation d'un composé de type rétinol, notamment l'acide rétinol pour contrôler l'équilibre énergétique chez l'homme, l'animal ou le végétal.

- Dans les applications qui ont été citées, qui visent
- 30 notamment le traitement de pathologies diverses, les composés préférés sont les mêmes que ceux qui ont été cités comme particulièrement avantageux pour moduler l'activité découplante des protéines de découplage. Il s'agit donc en particulier des

acides rétinoïques et de leurs dérivés, notamment des acides rétinoïques 9-cis et tout trans.

Enfin, l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation de l'acide rétinoïque pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'obésité.

Les composés de type rétinoïde dans les applications envisagées, peuvent être dosés et formulés sous les formes habituelles convenant pour tous les modes d'administration couramment envisageables.

L'invention sera illustrée par les exemples suivants, qui mettent en évidence l'effet de l'acide rétinoïque tout trans sur l'augmentation de l'activité des protéines UCP1 et UCP2 dans les mitochondries de levure.

Les figures 1 à 6 complètent l'illustration de l'invention.

La Figure 1 représente la structure de l'acide rétinoïque tout trans et de l'acide rétinoïque 9-cis qui constituent des exemples de composés de type rétinoïde selon l'invention.

La Figure 2 représente une courbe de réponse des mitochondries de levure à l'acide rétinoïque. En abscisse figure le rapport molaire acide rétinoïque / albumine (concentration en albumine : 1.6 micromolaire dans le milieu) ; en ordonnée figure le facteur de stimulation de la respiration basale. La Figure 2a a été obtenue à pH : 6.8 et la Figure 2b à pH : 7.3.

La Figure 3 est analogue à la Figure 2 mais avec l'acide palmitique qui constitue un exemple comparatif négatif puisqu'il apparaît que UCP2 ne répond pas à l'acide palmitique. Sur ces courbes :

- représente la réponse en absence de protéine UCP (contrôle) ;
- ▲ représente la réponse en présence de protéine UCP1 ;
- représente la réponse en présence de protéine UCP2.

La Figure 4 représente le même type de courbes mais en réponse à différents pH, soit avec un rapport molaire acide rétinoïque : albumine de 3 : 1 (Fig 4a) soit avec un rapport molaire acide rétinoïque : albumine de 4 : 1 (Fig 4b), en absence (●) ou en présence de la protéine UCP2 ■.

La Figure 5 est analogue à la Figure 4 mais correspond à un exemple comparatif avec l'acide palmitique (Figure 4a : rapport molaire acide palmitique : albumine de 3 : 1 ; Figure 4b : rapport molaire acide palmitique : albumine de 4 : 1).

- 5 La Figure 6 met en évidence la variation du potentiel membranaire et de la respiration de mitochondries de levures (reflets de l'activité découplante de la protéine UCP1) sous l'effet de l'acide rétinoïque. La courbe du haut traduit la consommation d'oxygène (exprimée en nanomoles d'oxygène par minute et par milligramme de protéines mitochondriales) et la courbe du bas, le potentiel membranaire. La Figure 6a correspond à des mesures effectuées chez des mitochondries de levure dépourvues de protéines UCP et la Figure 6b correspond à des mesures effectuées chez des mitochondries de levure où la
- 10 protéine UCP1 est exprimée.

N : désigne l'addition de NADH (substrat respiratoire) ;

R : désigne l'addition d'acide rétinoïque (avec respectivement un rapport molaire acide rétinoïque : albumine de 2 : 1 et 4 : 1) ;

- 20 G : désigne l'addition de guanosine diphosphate 1 millimolaire (inhibiteur de la protéine UCP1).

L'échelle de temps est de 4 minutes et la base de consommation d'oxygène est 100 nmole d'oxygène.

- Les exemples qui suivent mettent en évidence d'une part,
- 25 l'augmentation de l'activité découplante de la protéine UCP2, en présence d'acide rétinoïque tout trans, et l'absence d'une telle augmentation en présence d'acide palmitique chez des mitochondries de *Saccharomyces Cerevisiae*. D'autre part, ils mettent en évidence l'augmentation de l'activité découplante de
- 30 la protéine UCP1 en présence d'acide rétinoïque et en présence d'acide palmitique chez des mitochondries de *Saccharomyces Cerevisiae*.

Exemple 1 : Construction d'un modèle pour la détermination de l'activité de la protéine UCP2 dans les levures.

1. Matériels et méthodes

D'une manière générale, les enzymes de restriction et de modification sont celles commercialisées par Appligène ou Biolabs. La Taq polymérase pour les réactions d'amplification par réaction en chaîne est obtenue de la société Perkin-Elmer. On peut aussi utiliser les polymérases Vent ADN commercialisées par Biolabs. Les composants de base des milieux de culture proviennent des Laboratoires Difco, la Cytohélicase provient de la société IBF Biotechnics. Tous les autres réactifs utilisés sont de la plus grande pureté disponible.

2. Construction de souches *Saccharomyces Cerevisiae* recombinantes, capables d'exprimer la protéine UCP2.

Les détails des matériels et méthodes employés pour construire les souches et sélectionner les recombinants exprimant la protéine UCP2 sont par analogie ceux décrits dans la publication Arechaga et al. (Biochem. J. (1993) 296, 693-700) qui décrit l'expression de la protéine UCP1 dans *Saccharomyces Cerevisiae* et dont le contenu est ici incorporé par référence. L'obtention du plasmide contrôle ne produisant aucune protéine UCP2 est également décrite dans cette publication.

Le cDNA de la protéine UCP2 de souris (C. Fleury et al. (1997) Uncoupling protein-2 : a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. Nature genetics, 15, 269-272), dépourvu de régions non traduites 5' et 3' est obtenu par amplification enzymatique avec les oligonucléotides suivants :

. amorce 5' : OL266 (aatcGAATTC atg gtt ggt ttc aag gcc)

. amorce 3' : OL267 (ggagGAGC TCa gaa agg tgc ctc ccg a)

Les sites de restrictions EcoRI et SacI sont indiqués en capitales, le cadre de lecture étant signalé par les espaces.

Le produit d'amplification est alors introduit dans le vecteur pYeDP 1/8-10 (Cullin C., et Pompon D., (1988) Gene 65, 203-217).

Le produit d'ADN résultant est réparé avec un enzyme de Klenow puis coupé avec EcoRI et SacI. Ceci force au clonage dans le vecteur pYeDP-1/8-10. Dans chaque cas l'insert d'ADN codant

pour la protéine UCP2 dans le vecteur pYeDP a été séquencé pour vérifier que la séquence codante avait bien les propriétés attendues. Le vecteur pYeDP-UCP d'expression de la protéine UCP2 est introduit dans une souche de levure diploïde W303 de *Saccharomyces Cerevisiae*, (a/α ; ade2-10 ; his3-11/15 ; leu2-3,112 ; ura3-1 ; can1-100 ; trp-) par électroporation et les transformants sont sélectionnés pour leur autotrophie à l'uracile.

3. Préparation des mitochondries.

On utilise une procédure dérivée de celle décrite par Guérin et al. (Guérin B., Labbe P. et Somlo, M. (1979) *Methods Enzymol* ; 55, 149-159). 36 heures avant l'extraction des mitochondries, on réalise une pré-culture en milieu SP (0.67 % de base azotée de levure ; 0.1 % KH₂PO₄, 0.12 % (NH₄)₂SO₄, 0.1 % de glucose, 2% d'acide lactique, 0.1 % de casaminoacides, 20 mg/l de tryptophane, 40 mg/l d'adenine pH 4.5), 10 ou 12 heures avant la récolte, on effectue une dilution en milieu SG (2% de galactose, 0.67 % de base azotée de levure, 0.1 de casaminoacides, 20 mg/l de tryptophane et 40 mg/l d'adénine, à une densité optique de 0.35 à 0.4).

On prépare des protoplastes par digestion enzymatique avec la cytohélicase et on isole des mitochondries par centrifugation différentielle après homogénéisation des protoplastes obtenus par digestion enzymatique de la paroi cellulaire.

4. Mesure de l'activité de la protéine UCP2.

Cette activité peut être mesurée de façon qualitative ou quantitative, à l'aide de deux paramètres :

- qualitativement,

- Le potentiel membranaire mitochondriale ; l'augmentation de l'activité d'une protéine de découplage, est reflétée par une diminution du potentiel membranaire et une augmentation résultante de la consommation d'oxygène. Cette augmentation correspond à son tour à une augmentation de la dissipation de l'énergie.

quantitativement :

- la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène) qui est directement reliée à la quantité de substrat consommée par les mitochondries.

- 5 Seule, la mesure quantitative de la respiration mitochondriale a été effectuée pour UCP2. Cette mesure est effectuée à 20°C dans une chambre à électrode à oxygène (électrode de Clark) commercialisée par la société HANSATECH. Le milieu d'incubation contient 0.65M de mannitol, 10mM de Tris/Maléate, 0.5mM EGTA,
10 2mM MgCl₂, 10mM K₂HPO₄, 1mg/ml (16µM) d'albumine, pH 6.8).

La concentration mitochondriale est de 0.15 mg/ml. En tant que substrat on utilise NADH (3mM) car les mitochondries de *Saccharomyces Cerevisiae* sont capables d'oxyder du NADH d'origine externe.

- 15 Exemple 2 : Mesure de l'activité de la protéine UCP2 en présence d'acide rétinolique tout trans.

Les expériences sont menées en faisant varier soit le pH, soit la concentration en acide rétinolique dans le milieu. Les concentrations d'acide rétinolique libre sont estimées à quelques
20 dizaines de nanomaires (déterminées en fixant le rapport molaire acide rétinolique : albumine). La concentration en albumine est 0.1 mg/ml (1.6µM) dans le tampon de respiration et les pH testés sont respectivement 6.8 ; 7.1 ; 7.3 ou 7.5. Les autres
25 composants du tampon sont identiques à ceux de l'exemple 1, et aux mêmes concentrations.

Exemple 3 : Résultats :

Les résultats apparaissent aux figures 2 à 5 qui indiquent, par la valeur du facteur de stimulation de la respiration, de
30 combien la respiration est stimulée par référence à la valeur de base de la respiration.

On observe que l'activation de UCP2 en présence d'acide rétinolique, est fortement influencée par le pH (Figures 2 et 4).

Il n'y a pas d'augmentation notable de l'activité de UCP2 à un pH de 6.8. Par contre, l'augmentation est très sensible à un pH
35 de 7.3 qui correspond au pH à l'intérieur des cellules

(Figures 2a et 2b). La concentration en acide rétinoïque ne semble pas jouer un rôle essentiel. On observe simplement une légère augmentation de l'activité de la protéine UCP2 lorsque la concentration en acide rétinoïque augmente (Figures 4a et 4b).

5 Exemple 4 : Exemple comparatif avec l'acide palmitique.

Les Figures 3b et 5 indiquent clairement que l'acide palmitique n'a pas d'effet sur l'activité de la protéine UCP2. On note simplement une légère augmentation avec le pH et avec l'augmentation de la concentration en acide palmitique (Figure 5).

10 Exemple 5 : Des expériences comparables ont été menées avec d'autres composés. On n'a constaté aucune activation de l'activité de la protéine UCP2 en présence de rétinol, d'acide arachidonique, d'acide abscissique, d'acide indole acétique ou
15 d'acide salicylique.

Exemple 6 : Utilisation du modèle pour la détermination de l'activité de la protéine UCPI dans les levures.

La construction des vecteurs d'expression, des souches recombinantes *Saccharomyces Cerevisiae*, la préparation des
20 mitochondries et la mesure de l'activité de la protéine UCPI sont décrites dans la publication Arechaga et al. déjà citée à l'exemple 1. En particulier, l'ADNc codant pour la protéine UCPI entre le site interne *SacI* (110 nucléotides avant le codon ATG) et le site *pstI* créé pendant la procédure de clonage
25 (Bouillaud F. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 445-448 et Bouillaud F. et al. (1986) J. Biol. Chem. 261, 1487-1490) est introduit dans un vecteur pTZ 19 commercialisé par Pharmacia. Le plasmide est linéarisé avec *PstI*, réparé avec l'enzyme de Klenow et auto-ligaturé en présence d'un excès de
30 liens *EcoRI* (Appligene). On obtient un plasmide ZIBIRI, d'où l'ADNc peut être excisé avec *EcoRI*. Cet insert est ligaturé dans le vecteur pSELECT (Promega). L'ADNc de la protéine UCPI, dépourvu de régions non traduites en 5' et 3', est obtenu par amplification enzymatique avec les amorces suivantes,
35 complémentaires de l'ADNc :

amorce 5' : OL5 (CGAGAATTCTATGGTGAGTTCGACAACTTC)

amorce 3' : OL6 (CAAGAATTCTATGTGGTGCAGTCCACTGT)

Cette procédure a permis d'introduire deux sites *EcoRI* (en italiques) aussi près que possible des codons ATG et TAG (soulignés). Après réparation avec l'enzyme de Klenow, on coupe avec *EcoRI* et le produit d'amplification est introduit dans le vecteur pYeDP- 1/8-10.

Cette étape finale de clonage donne lieu à deux plasmides différents :

- 10 . pYeDP-UCP+ dans lequel on s'attend à ce que la séquence codante de UCP2 donne un ARNm codant pour la protéine UCP1, et ;
pYeDP-UCP- dans lequel l'ADNc est en orientation contraire et dont on s'attend à ce qu'il donne un ARN antisens.

15 Les étapes suivantes de construction des souches recombinantes, de préparation des mitochondries et de mesure de l'activité de UCP1 sont décrites dans la publication Arechaga et al.

Exemple 7 : Résultats sur l'activité de la protéine UCP1.

20 Les résultats sont en partie reproduits aux Figures 2 et 3 ainsi qu'à la Figure 6.

Sur la Figure 2, il apparaît que la protéine UCP1 répond à l'acide rétinoïque à pH = 6.8 (Figure 2a), ce qui n'est pas le cas pour la protéine UCP2.

25 La Figure 3a démontre que la protéine UCP1 répond à l'acide palmitique, ce qui n'est pas le cas pour la protéine UCP2.

Enfin, la Figure 6 montre que l'addition d'acide rétinoïque dans des mitochondries de levure induit une baisse du potentiel de membrane et une accélération de la consommation d'oxygène, ce qui indique que l'activité observée est bien un phénomène de
30 découplage (Figure 6b).

Cet effet n'est pas observé sur les mitochondries dépourvues de protéine UCP (Figure 6a).

REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'un composé de type rétinoïde, notamment l'acide rétinoïque pour la préparation d'un médicament capable de moduler in vivo l'activité découplante de protéines de découplage.
- 10 2. Utilisation d'un composé de type rétinoïde, notamment l'acide rétinoïque pour la préparation d'un médicament capable d'augmenter l'activité découplante de la protéine UCP2.
- 15 3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit composé de type rétinoïde est choisi parmi les acides rétinoïques et leurs dérivés.
- 20 4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdits acides rétinoïques sont choisis parmi les acides rétinoïques 9-cis et tout trans.
5. Utilisation de l'acide rétinoïque pour la préparation d'un médicament capable d'augmenter l'activité découplante de la protéine UCP2.
- 25 6. Utilisation d'un composé de type rétinoïde, notamment l'acide rétinoïque, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies associées à une augmentation ou une diminution de l'activité découplante de protéines de découplage.
- 30 7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de pathologies associées à une diminution de l'activité découplante de la protéine UCP2.
- 35 8. Utilisation selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de l'obésité.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de désordres physiologiques ou maladies liées à l'obésité.

5

10. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné notamment au traitement de maladies affectant l'état métabolique général.

10 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite maladie est choisie notamment parmi les différentes formes de diabète, l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose, le syndrome X ou les maladies cardiovasculaires.

15 12. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de pathologies affectant le métabolisme de l'oxygène ou de maladies du système de défense immunitaire.

20 13. Utilisation d'un composé de type rétinoïde, notamment l'acide rétinoïque, pour la préparation d'un médicament destiné aux traitements des pathologies associées à la régulation de la dépense énergétique.

25 14. Utilisation d'un composé de type rétinoïde, notamment l'acide rétinoïque pour contrôler l'équilibre énergétique chez l'homme, l'animal ou le végétal.

30 15. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 14, caractérisée en ce que ledit composé de type rétinoïde est choisi parmi les acides rétinoïques et leurs dérivés.

35 16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que lesdits acides rétinoïques sont choisis parmi les acides rétinoïques 9-cis et tout trans.

100

1

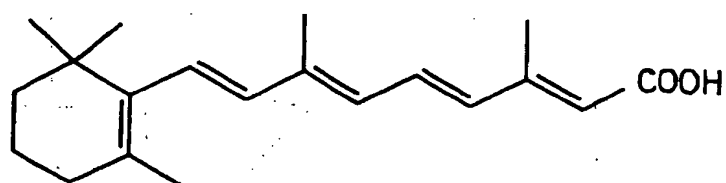
•

•

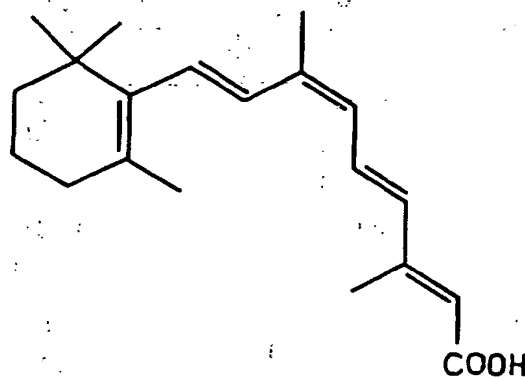
1.

•

1 / 6



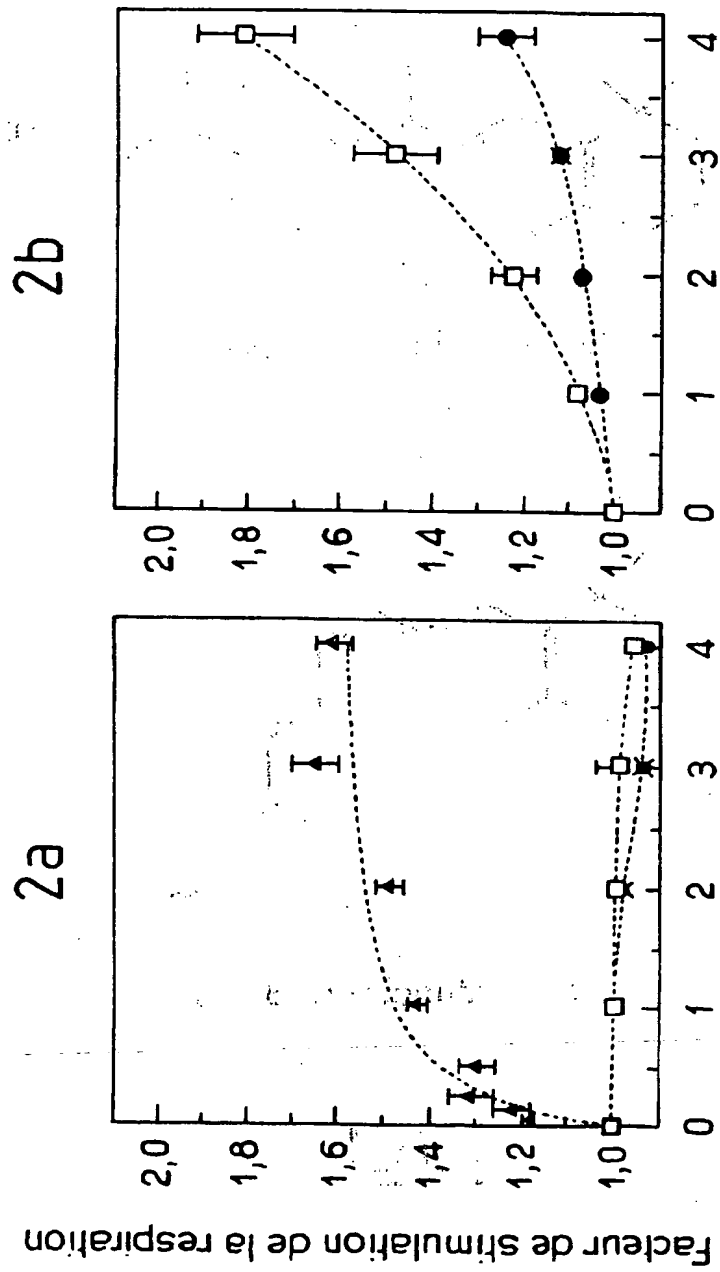
Acide rétinoïque trans



Acide rétinoïque 9.cis

FIG. 1

2 / 6

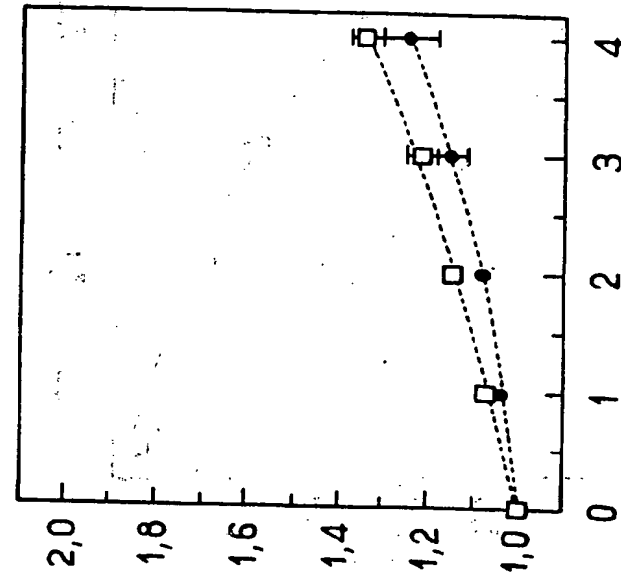


- Contrôle (pas d'UCP)
- ▲ UCP1
- UCP2

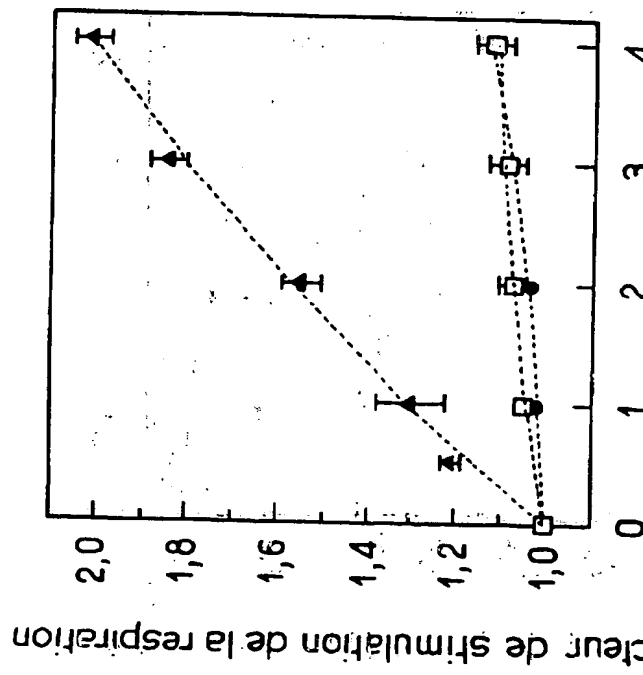
FIG. 2

3 / 6

3b



3a



Rapport molaire acide palmitique : albumine

FIG. 3

- Contrôle (pas d'UCP)
- ▲ UCP1
- UCP2

4 / 6

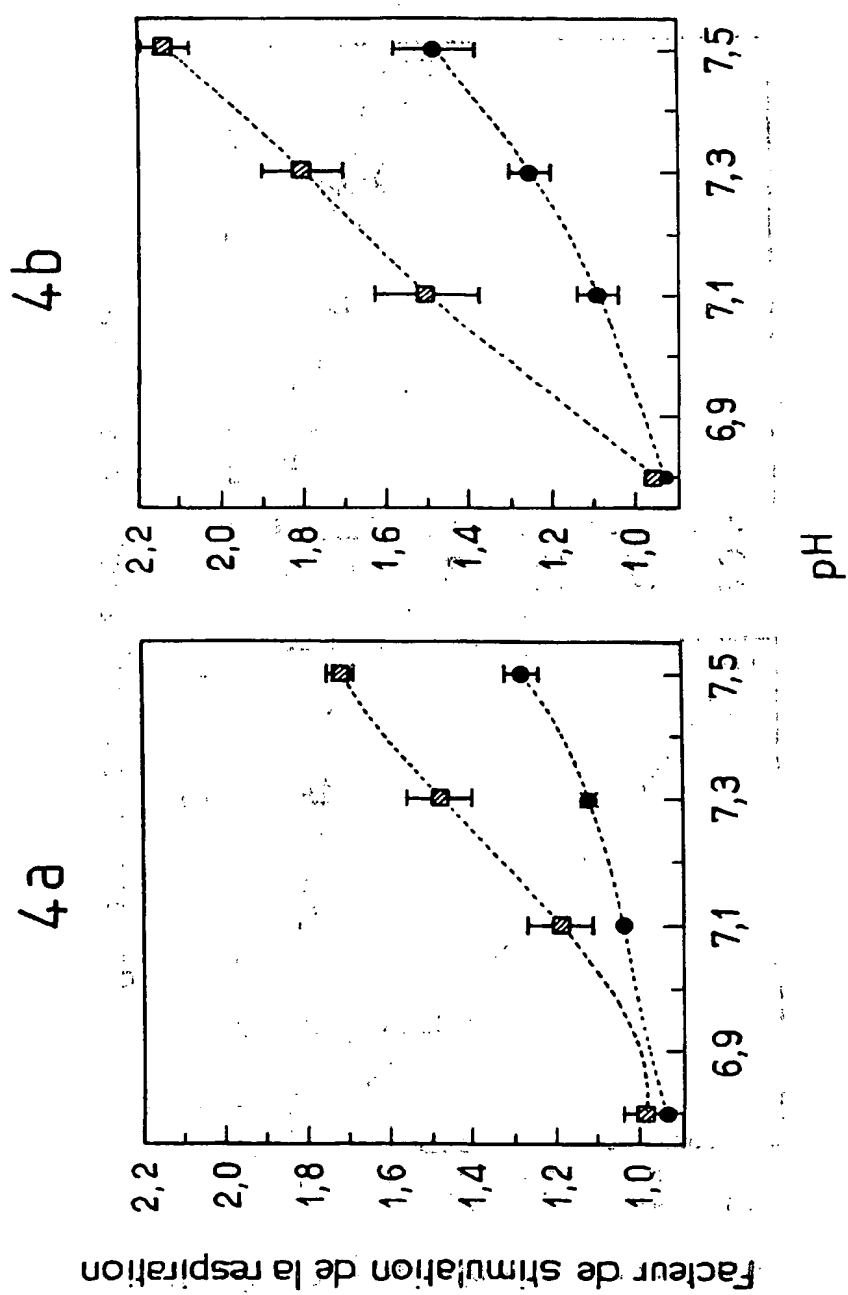
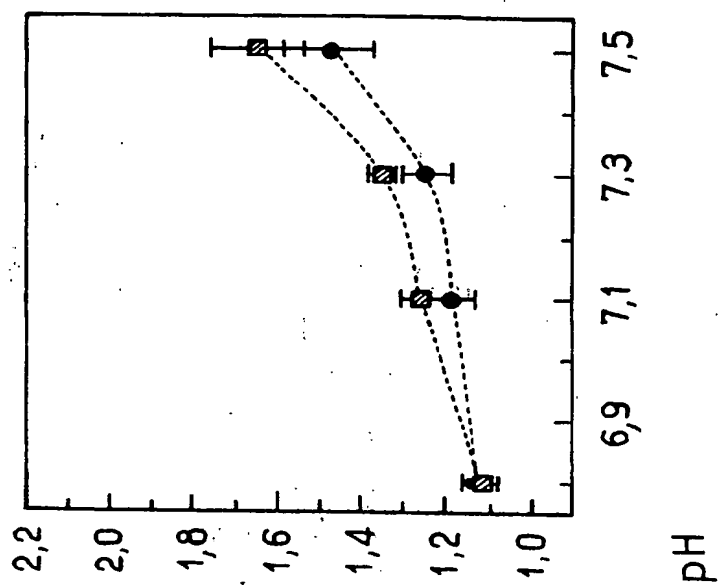
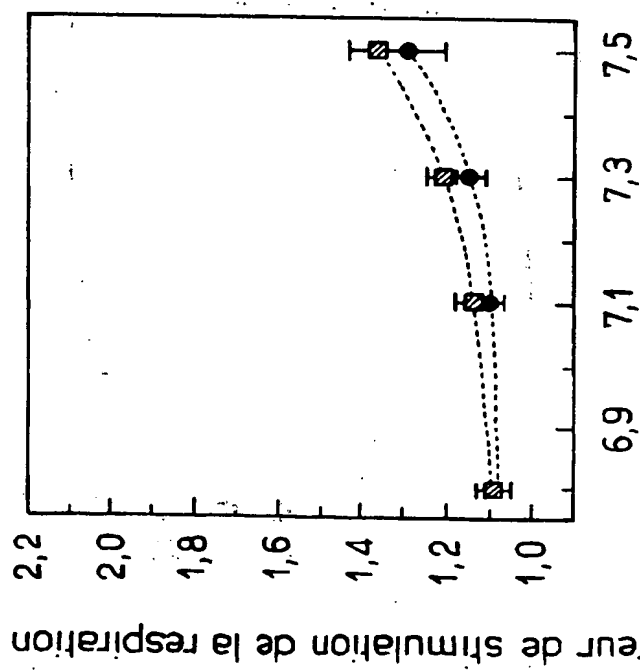


FIG. 4

5b



5a

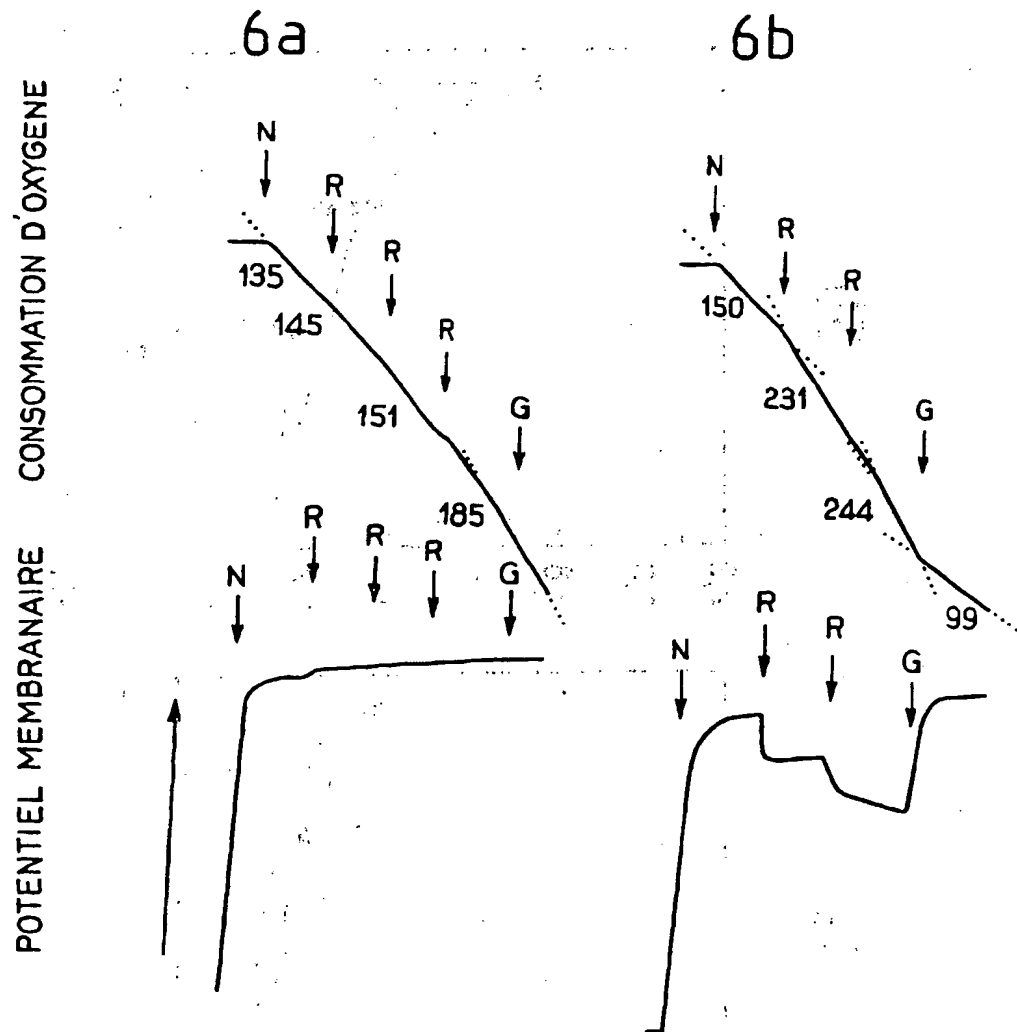
FIG. 5

● Contrôle (pas d'UCP)

▨ UCP2

Facteur de stimulation de la respiration

6 / 6

FIG. 6

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE

N° d'enregistrement
national

PRELIMINAIRE

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 547729

FR 9710009

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	P. PUIGSERVER ET AL.: "IN-VITRO AND IN VIVO INDUCTION OF BROWN ADIPOCYTE UNCOUPLING PROTEIN (THERMOGENIN) BY RETINOIC ACID" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 317, no. 3, 1996, pages 827-833, XP002064277 * le document en entier *	1-10, 13-17
X	M.V. KUMAR ET AL.: "DIFFERENTIAL EFFECTS OF RETINOIC ACID ON UNCOUPLING PROTEIN AND LEPTIN GENE EXPRESSION" FASEB JOURNAL, vol. 11, no. 3, avril 1997, page A374 XP002064278 * le document en entier *	1-7, 13-16
X	G. WOLF: "A REGULATORY PATHWAY OF THERMOGENESIS IN BROWN FAT THROUGH RETINOIC ACID" NUTRITION REVIEWS, vol. 53, no. 8, 1995, pages 230-231, XP002064279 * le document en entier *	1-7, 13-16
X	WO 97 10819 A (LIGAND PHARM INC) * abrégé * * page 2, ligne 19 - page 3, ligne 23 * * page 5, ligne 29 - page 6, ligne 2 * * page 15, ligne 7 - ligne 9; revendications 1,7,8,13,17 *	1-11, 15-17
X	EP 0 698 392 A (OREAL) * le document en entier *	1-7, 9-11,15, 16
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
11 mai 1998		Hoff, P
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.92 (P/4C13)

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREN° d'enregistrement
nationalde la
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 547729

FR 9710009

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 95 18533 A (UNIV. PENNSYLVANIA) * abrégé * * page 3, ligne 23 - ligne 33 * * page 9, ligne 3 - page 10, ligne 13 * * page 16, ligne 21 - page 17, ligne 6; revendication 3 *	1-9, 15-17
X	EP 0 749 752 A (CIRD GALDERMA) * abrégé * * page 3, ligne 23 - ligne 26 * * page 4, ligne 32 - page 5, ligne 25; revendications 1-6 *	1-11, 15-17
X	EP 0 579 915 A (HOFFMANN LA ROCHE) * abrégé * * page 2, ligne 1 - ligne 12 * * page 3, ligne 56 - page 4, ligne 5; revendications *	1-7, 10-12, 15,16
X	WO 94 26277 A (RES DEV FOUNDATION ; AGGARWAL BHARAT B (US); MEHTA KAPIL (US)) * abrégé * * page 8, ligne 3 - ligne 15; revendications *	1-7,12, 15,16
X	US 5 219 888 A (KATOC S JR. ANDREW S ET AL) * le document en entier *	1-7,10, 11,15,16
X	WO 96 24344 A (WARNER LAMBERT CO) * abrégé * * page 3, ligne 11 - ligne 28; revendications *	1-7,10, 11,15,16
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
11 mai 1998		Hoff, P
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date, de dépôt ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2767058

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement
national

FA 547729
FR 9710009

établi sur la base des données et indications
déposées avant le commencement de la recherche

[illegible]